

· 临床论著 ·

应用吲哚青绿试验与血栓弹力图替代去唾液酸糖蛋白受体分析定量评估肝储备功能

张珂 蒋力 贾哲 李宝亮 赫嵘 黄容海 鲁岩 李勤涛 丁振昊 郭立民 穆毅

【摘要】目的 应用吲哚青绿实验与血栓弹力图检测指标, 替代肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体分析, 建立肝储备功能定量评估系统, 并与 Child-Pugh 评分进行比较, 了解其在肝切除术患者肝储备功能评估中的临床应用价值。**方法** 对 2012 年 1 月 1 日至 12 月 31 日于本科室行肝部分切除术肝占位病变的患者共 55 例, 测量 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 、ICGR15、EHLBF、R 值与 K 值, 建立以 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 为因变量 (Y), ICGR15、EHLBF、R 值与 K 值为自变量 (Xn) 的肝储备功能定量评估系统, 与 Child-Pugh 评分进行比较, 了解两种方法预测术后肝功能代偿情况的准确率。**结果** Child-Pugh 预测术后肝功能代偿良好准确率为 56.67%, Y 值预测术后肝功能代偿良好准确率为 84.62% ($\chi^2 = 5.374$, $P = 0.020$); Child-Pugh 预测术后肝功能代偿不全准确率为 76.00%, Y 值预测术后肝功能代偿不全准确率为 96.55% ($\chi^2 = 5.400$, $P = 0.020$)。**结论** 建立的肝储备功能定量评估系统能够更全面评价肝切除患者围手术期肝储备功能。

【关键词】 肝切除; 肝储备; 去唾液酸糖蛋白受体; 吲哚青绿试验; 血栓弹力图; Child-Pugh 评分

Assessment of hepatic functional reserve by converted asialoglycoprotein receptor values calculated from parameters of indocyanine green test and thromboelastograph ZHANG Ke, JIANG Li, JIA Zhe, LI Baoliang, HE Rong, HUANG Ronghai, LU Yan, LI Qintao, DING Zhenhao, GUO Limin, MU Yi. Department of Hepatobiliary Surgery, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: MU Yi, Email: muyi001@sina.com

【Abstract】Objective To verify the value of asialoglycoprotein receptors (ASGPR) analyzed by flow cytometry (FCM) in assessing hepatic functional reserve, and establish a conversion formula for the ASGPR value with the parameters of indocyanine green (ICG) test and thromboelastography (TEG). This assessment method was compared with the Child-Pugh score to evaluate its predictive value for hepatic functional reserve in patients undergoing liver resection. **Methods** Total of 55 patients with liver tumors had partial hepatectomy in our department from January 1st to December 31st, 2012. The percentages of ASGPR⁺ hepatocyte ($\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$), ICGR15, effective hepatic blood flow (EHLBF), R value and K value were examined to establish the quantitative assessment method for liver functional reserve. The $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ was defined as a dependent variable (Y) while the ICGR15, EHLBF, R value and K value were defined as independent variables (Xn). The accuracy of predicted postoperative liver compensation was obtained from the follow-up information and was compared with that predicted by Child-Pugh score. **Results** The accuracy of Child-Pugh score predicting postoperative hepatic functional reserve was 56.67%, while that of our method (the Y value) was 84.62% ($\chi^2 = 5.374$, $P = 0.020$). The accuracy of Child-Pugh score predicting postoperative hepatic decompensation was 76.00%, while that of the Y value was 96.55% ($\chi^2 = 5.400$, $P = 0.020$). **Conclusions** Our established quantitative assessment method for hepatic functional reserve could provide a comprehensive evaluation of perioperative liver reserve in patients undergoing hepatectomy

【Key words】 Liver resection; Hepatic reserve function; Asialoglycoprotein receptor; Indocyanine green test; Thromboelastogram; Child-Pugh classification

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.03.010

基金项目: 首都临床特色应用研究项目 (No. Z111107058811048)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院肝胆外科

通讯作者: 穆毅, Email: muyi001@sina.com

对合并慢性病毒性肝炎、肝纤维化与肝硬化等基础肝病的肝部分切除术患者,术前肝储备功能评估是决定手术方式、手术安全及预后的关键环节之一。慢性肝病尤其是病毒性肝炎后肝硬化,肝组织结构破坏严重,即便是代偿期肝硬化,其肝储备功能也存在不同程度受损,经受麻醉和手术创伤打击后,肝功能恢复缓慢,术后易于发生严重的并发症,甚至因肝功能衰竭而死亡^[1]。目前临床上常以 Child-Pugh 分级评价肝储备功能,虽然其评估指标简单,便于临床使用,但客观预测机体应激状态下肝储备功能尚不够精确^[2]。去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)是肝细胞表达的膜表面蛋白,其数量、功能与肝细胞的功能呈正相关,是评价肝储备功能的敏感方法^[3-4]。本研究通过分析肝切除患者肝细胞表面 ASGPR 与吲哚青绿试验和血栓弹力图检测指标间的关系,为预测肝切除手术风险与预后提供更为准确的肝储备功能定量评价新方法,报道如下。

资料与方法

一、研究对象

2012年1月1日至12月31日共有86例肝占位病变患者在本科室接受肝部分切除术。其中58例符合研究对象筛选标准:年龄 ≥ 18 岁 $\sim \leq 60$ 岁,无心、肺、脑、肾等重要脏器功能障碍,无难以控制的高血压、糖尿病等基础内科疾病,除肝脏外无其他脏器良恶性肿瘤。55例患者同意参加本研究,并签订书面知情同意书,其中男性37例,女性18例,平均年龄为 (46.42 ± 8.79) 岁,无基础肝病的肝海绵状血管瘤10例,45例合并病毒性肝炎后肝硬化(其中HBV感染者32例,HCV感染者13例)。行局部肝切除27例,左半肝切除5例,左外叶切除8例,右半肝切除4例,右前叶切除6例,右后叶切除5例,术中常规采用 Pringle 法间歇阻断第一肝门,以减少术中出血。本研究经首都医科大学附属北京地坛医院医学伦理委员会审核通过。

二、方法

1. 流式细胞仪测定 ASGPR 阳性肝细胞比例(The percentages of ASGPR⁺ hepatocyte, PHC^{ASGPR+}):术中切除肝肿瘤标本后,立刻无菌留取瘤旁5 mm外1 cm³大不同部位正常肝组织3~5块,并立即送检。HBSS液去除肝组织中红细胞。将肝组织剪呈1~2 mm³碎块,0.05% II型胶原酶37℃消化10 min,过200目细胞筛网,2% FBS/

DMEM 终止消化。1 200 r/min 离心5 min(离心半径 $r = 13.5$ cm),弃上清,加入3~5 ml HBSS液重悬细胞。相差显微镜观察肝细胞形态并计数,保持细胞至 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6/\text{ml}$,0~4℃备用。取肝细胞悬液50~100 μl ,加入5 μl FITC-anti-ASGR1(HyCult Biotechnology, 荷兰),4℃孵育30 min。1 000 r/min 离心5 min,弃上清,加入1 ml HBSS液重悬细胞。1 000 r/min 离心5 min,HBSS液洗涤细胞2次,用HBSS液稀释至细胞数 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6/\text{ml}$ 。取样上机检测肝细胞 ASGPR,计算机分析软件自动计算 PHC^{ASGPR+}。以标记 FITC 的小鼠同型 IgG1 为阴性对照。每块肝组织均行 PHC^{ASGPR+} 检测,计算其平均值作为最终 PHC^{ASGPR+} 表达水平。

2. 吲哚青绿试验:术前3 d以 DDG-3300K 分析仪(Nihon Kohden Corporation, Japan)行吲哚青绿试验。患者安静卧床,ICG试剂稀释为5 mg/ml,经肘静脉按0.5 mg/kg 剂量注入 ICG 试剂,鼻夹探头持续测定血 ICG 浓度并自动计算吲哚青绿15 min 滞留率(indocyanine green retention at 15 minutes, ICGR15)及有效肝血流量(effective hepatic blood flow, EHBF)。

3. 血栓弹力图(thrombelastogram, TEG)描记:术前3天取外周静脉血1.2 ml 注入管瓶激活,预置温度37℃,吸取0.36 ml 注入测定杯放置入 Haemoscope 500 series 血栓弹力图仪(Haemonetics Corporation, USA),测定杯4°45' 旋转,每周期为10 s,描记 TEG 图像,记录 R 值与 K 值。

4. 建立肝储备功能定量评估回归方程:以 PHC^{ASGPR+} 为应变变量(Y),以 ICGR15、EHBF、R 值与 K 值为自变量(X_n),通过多元线性回归分析,建立回归方程。

5. 观察指标:了解术后恢复情况。观察至术后2周,Child-Pugh 分级评价术后肝功能恢复,A 级为肝功能代偿良好,B/C 级为肝功能代偿不全。对术前不同 Child-Pugh 分级与 Y 值患者,进行术后肝功能恢复情况间的比较。

三、统计学处理

统计学处理采用 SPSS 13.0 软件,统计资料表达采用 $\bar{x} \pm s$,多元线性回归分析建立回归方程,对回归方程应变变量进行受试者工作特征(receiver-operator characteristic, ROC)曲线分析。计数资料行 Likelihood ratio 卡方检验,计量资料行独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、术后恢复情况

本组患者手术过程顺利,无围手术期死亡病例,均于术后1个月内出院。术后观察期内23例患者为Child-Pugh A级,29例为B级,3例为C级。按术后肝功能恢复情况分为代偿良好与代偿不全两组,两组患者手术情况无差异,见表1。

二、肝储备功能定量评估系统的建立

根据多元线性回归模型采用逐步分析法建立回归方程为 $Y(\%) = 74.865 + 0.016 \times \text{EHBF}(\text{ml/min}) - 0.424 \times R(\text{min}) - 0.343 \times \text{ICGR15}(\%) - 0.567 \times K(\text{min})$ 。模型方差分析 $F = 148.488$,显著性概率为0.000,提示方程有意义。经多元回归假设检验 $F = 7.330$, $P < 0.001$,回归方程相关十分显著。 $R^2 = 0.922$, Adjusted $R^2 = 0.916$,该模型能够解释 $\text{PHC}^{\text{ASGPR+}}$ 90%以上的变差。Y值ROC曲线分析(图1),曲线下面积(the area under the curve, AUC)为0.869,最佳临界值为64.54%,其敏感度为91.4%,特异性为85%。全部病例中 $Y > 64.54\%$ 患者26例, $Y \leq 64.54\%$ 患者29例。

三、术后肝功能恢复情况

术前Child-Pugh A级患者共30例,其中术后17例为A级,13例为B级,无C级病例,术后肝功

能代偿良好预测准确率为56.67%;术前Child-Pugh B级患者25例,其中术后6例为A级,16例为B级,3例为C级,其预测术后肝功能代偿不全准确率为76.00%。26例 $Y > 64.54\%$ 患者,术后22例为A级,4例为B级,术后肝功能代偿良好预测准确率为84.62%,与Child-Pugh分级比较差异显著($\chi^2 = 5.374$, $P = 0.020$);29例 $Y \leq 64.54\%$ 患者,术后1例为A级,25例为B级,3例为C级,术后肝功能代不全预测准确率为96.55%,与Child-Pugh分级比较差异显著($\chi^2 = 5.400$, $P = 0.020$)。

讨 论

随着外科手术技术的进步,目前仅就肝脏外科而言,已无手术禁区。然而术后肝功能不全,甚至肝功能衰竭,仍然是影响肝部分切除术患者手术疗效和近远期预后的关键因素。在我国多数原发性肝癌患者合并HBV感染,慢性乙型肝炎、肝纤维化,甚至肝硬化等基础肝病,往往造成患者承受麻醉和手术创伤能力显著下降,也因此如何在术前准确评价肝储备功能,并由此设计精准的手术肝脏切除量,是决定肝部分切除术患者预后的关键因素。

肝脏是人体最大的实质器官,也是人体的代谢中心器官,其功能复杂,如何准确评估肝脏储备功能一直是肝脏病学专业领域的核心研究内容之一。迄今为止,有多种肝储备功能评价方法应用于临床。Child-Pugh评分是临床中最普遍使用的肝储备功能评估方法,随着应用经验积累其局限性不断显现,尤其是Child-Pugh A级患者接受肝部分切除术后,仍有10%~15%的患者发生术后肝功能衰竭^[5],因此,国内外学者不断研究新的肝储备功能评估方法,以求能够更为精确地评估肝部分切除术患者术前肝储备功能,从而提高手术安全性并改善预后。MELD评分系统被认为是能够准确评价终末期肝病患者的肝储备功能评价体系,近十年来在欧美国家得到较为广泛的应用,曾被认为是能够取代Child-Pugh评分系统的更为精确的肝储备功能评估模型。然而,由于其没有形成明确的病情分级指标,

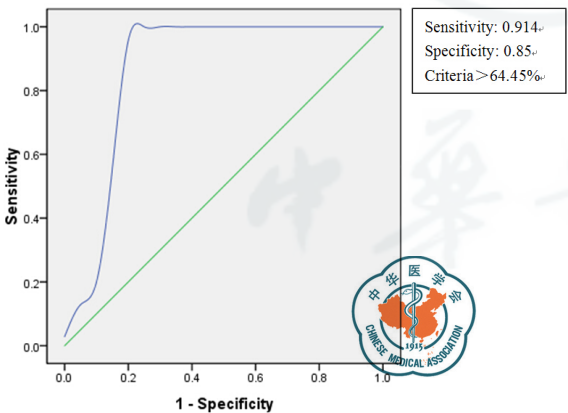


图1 Y值与术后肝功能代偿的ROC相关性曲线

表1 两组患者的手术情况的比较 ($\bar{x} \pm s$)

手术资料	肝功能代偿良好 (23例)	肝功能代偿不良 (32例)	t 或 χ^2	P
年龄(岁)	46.00 ± 8.52	46.72 ± 9.09	-0.297	0.768
手术时间(min)	133.48 ± 6.30	132.66 ± 5.53	0.513	0.610
术中出血量(ml)	526.09 ± 168.46	568.75 ± 130.60	-1.058	0.295
第一肝门阻断时间(min)	14.65 ± 3.01	15.22 ± 3.34	-0.647	0.521
手术方式(例) ^a	1/1/4/4/9	4/3/2/1/4/18	7.160	0.209

注:^a 左半肝切除/右半肝切除/右前叶切除/右后叶切除/左外叶切除/局部肝切除

使得其临床应用受到一定局限^[6]。

ASGPR 是存在于人和哺乳动物肝细胞表面的特异性受体,其主要功能是清除外周血中失去末端唾液酸而暴露半乳糖残基或乙酰半乳糖残基的糖蛋白、脂蛋白及凋亡细胞,其表达数量与功能状态直接反映肝细胞功能的正常与否,是精确反映肝储备功能的指标^[7]。目前通过 SPECT 检测 ^{99m}Tc-GSA 评估肝储备功能已在西方国家得到较为普遍的临床应用,由于其特殊的同位素显影,在检测全肝功能的同时,能够检测肝脏各解剖分叶功能,宜于术前肝切除手术方案的制定^[8-9],然而目前国内仅少数医学中心采用此项技术进行肝储备功能的科研工作,并未在临床中得到实际应用。

ICG 对人体无毒副作用,在人体内仅被肝细胞摄取,不参与生物转化和肝肠循环,最终经胆汁进入肠道以原形排出体外,测定血 ICGR15 能够反应肝细胞摄取与代谢功能^[10-11]。肝脏有效血流量是决定肝储备功能的关键因素之一^[12]。肝硬变造成肝细胞坏死、纤维组织增生、假小叶形成、肝内微循环异常,形成肝内解剖性及功能性分流增加,肝细胞有效供血供氧降低,进而影响肝储备功能^[13]。脉动色素浓度测定法行 DDG 试验,方法简便,能够同时完成 ICGR15 和 EHBf 测定,方便临床使用^[14]。

在肝脏外科领域,TEG 主要应用于肝移植术中无肝期与新肝植入后患者全身凝血功能的变化。TEG 参数中 R 值与 K 值分别代表机体凝血因子与纤维蛋白原合成水平。肝脏是合成凝血因子与纤维蛋白原的唯一场所,由于凝血因子与纤维蛋白原均为短半衰期蛋白,较半衰期较长的血清白蛋白等指标,能更灵敏反映肝脏合成功能^[15]。能否将 ICGR15、EHBf、R 值与 K 值有机结合,以替代 ASGPR 检测,建立一种便于临床使用,且能够精确反映肝储备功能定量评估方法,值得深入研究。

本研究中55例肝切除术患者,术后23例肝功能代偿良好,32例肝功能代偿不良。代偿良好组与代偿不全组在年龄、手术时间、术中出血量、第一肝门阻断时间和手术方式组成等方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。以 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 为应变量(Y),以 ICGR15、EHBf、R 值与 K 值为自变量(Xn),进行多元线性回归分析,提示自变量与应变量间呈显著相关,建立回归方程 $Y(\%) = 74.865 + 0.016 \times \text{EHBf}(\text{ml/min}) - 0.424 \times R(\text{min}) - 0.343 \times \text{ICGR15}(\%) - 0.567 \times K(\text{min})$,能够解

释 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 90% 以上的变差。Y 值 ROC 曲线下面积为 0.869,最佳临界值为 64.54%,反映术后肝功能代偿情况的敏感度为 91.4%,特异性为 85%。提示对于 $Y \leq 64.54\%$ 的肝切除患者,发生术后肝功能代偿不全的风险显著增加。本研究中3例术前为 Child-Pugh B 级患者,术后为 Child-Pugh C 级,其 Y 值均小于 55%,提示近半数功能性肝细胞受损,是造成肝储备功能显著低下,术后易于发生肝功能衰竭的高风险因素。

以 Y 值和 Child-Pugh 评分评估肝储备功能,其结果提示 Y 值预测术后肝功能代偿恢复情况的敏感度均高于 Child-Pugh 评分,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明涵盖 ICGR15、EHBf、R 值与 K 值,能够解释 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 90% 以上变差的肝储备功能定量评估系统,能够更准确反映肝切除患者承受麻醉及手术创伤的实际肝储备状况。

参考文献

- 1 姚珊珊,刘慧敏,刘艳民,等.乙型肝炎相关原发性肝癌患者的生存分析[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2013,7(1):55-59.
- 2 Schneider PD. Preoperative assessment of liver function[J]. Surg Clin North Am,2004,84(2):355-373.
- 3 Lee SML, Casey CA, McVicker BL. Impact of asialoglycoprotein receptor deficiency on the development of liver injury[J]. World J Gastroenterol,2009,15(10):1194-1200.
- 4 Kaibori M, Ha-Kawa SK, Maehara M, et al. Usefulness of Tc-99m-GSA scintigraphy for liver surgery[J]. Ann Nucl Med,2011,25(9):593-602.
- 5 Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD[J]. J Hepatol,2005,42(Suppl 1):S100-S 107.
- 6 SK Asrani, WR Kim. Model for end stage liver disease: end of the first decade[J]. Clin Liver Dis,2011,15(4):685-698.
- 7 Rigopoulou EI, Roggenbuck D, Smyk DS, et al. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: lost and found[J]. Autoimmun Rev,2012,12(2):260-269.
- 8 Manizate F, Hiotis SP, Labow D, et al. Liver functional reserve estimation: state of the art and relevance to local treatments. Oncology,2010,78(Suppl 1):131-134.
- 9 Seyama Y, Kokudo N. Assessment of liver function for safe hepatic resection[J]. Hepatol Res,2009,39(2):107-116.
- 10 Sheng QS, Lang R, He Q, et al. Indocyanine green clearance test and model for end-stage liver disease score of patients with liver cirrhosis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2009,8(1):46-49.
- 11 Akita H, Sasaki Y, Yamada T, et al. Real-time intraoperative assessment of residual liver functional reserve using pulse dye densitometry[J]. World J Surg,2008,32(12):2668-2674.
- 12 Zipprich A, Steudel N, Behrmann C, et al. Functional significance of hepatic arterial flow reserve in patients with cirrhosis[J]. Hepatology,2003,37(2):385-392.
- 13 石艳,肖绍树.肝炎肝硬化门脉高压并食管胃静脉曲张破裂出血与再出血危险性的预测[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(4):83-84.
- 14 Golse N, Bucur PO, Adam R, et al. New paradigms in post-hepatectomy liver failure[J]. J Gastrointest Surg,2013,17(3):593-605.
- 15 Stravitz RT. Potential applications of thromboelastography in patients with acute and chronic liver disease[J]. Gastroenterol Hepatol,2012,8(8):513-520.

(收稿日期:2013-12-21)

(本文编辑:孙荣华)

张珂,蒋力,贾哲,等.应用吲哚青绿试验与血栓弹力图替代去唾液酸糖蛋白受体分析定量评估肝储备功能[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2014,8(3):345-348.